

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт инженерной физики и радиоэлектроники  
Базовая кафедра фотоники и лазерных технологий

УТВЕРЖДАЮ  
Зав. баз. кафедрой ФилТ  
\_\_\_\_\_ А.Н. Втюрин  
«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Спектральное исследование связывание квантовой точки с белком

16.04.01 «Техническая физика»

16.04.01.02 «Оптическая физика и квантовая электроника»

Научный руководитель	_____	профессор, д-р физ.-мат.наук	Е.А. Слюсарева
Выпускник	_____		А.Г. Мережко
Рецензент	_____	ст. науч. сотр. ИФ СО РАН, канд. физ.-мат.наук	А.С. Александровский

Красноярск 2018

## РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Спектральное исследование связывания квантовой точки с белком» содержит 35 страниц текстового документа, 20 использованных источников.

КВАНТОВАЯ ТОЧКА, БЕЛОК, БЫЧИЙ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН, СВЯЗЫВАНИЕ, ТРИПТОФАНОВАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ, ЭНТРОПИЯ, ЭНТАЛЬПИЯ, ЭНЕРГИЯ ГИББСА.

Цель работы:

- о п р е д е л е н и е м е х а н и з м а и п а р а м е т р о в с в я з ы в а н и я к в а н т о в о й т о ч к и ( К Т ) с б е л к о м б ы ч ь е г о с ы в о р о т о ч н о г о а л ь б у м и н а ( Б С А ).

Задачи работы:

- о п р е д е л и т ь к о н с т а н т ы с в я з ы в а н и я Б С А с к в а н т о в о й т о ч к и п р и р а з л и ч н ы х т е м п е р а т у р а х ;

- о п р е д е л и т ь и з м е н е н и е т е р м о д и н а м и ч е с к и х п а р а м е т р о в п р и с в я з ы в а н и и Б С А с к в а н т о в о й т о ч к о й ;

- о п р е д е л и т ь с т е х и о м е т р и ю к о м п л е к с а Б С А – К Т .

Собственная флуоресценция является мощным инструментом для исследования структуры, динамики и процессов сворачивания – разворачивания белков ввиду высокой чувствительности различных параметров флуоресценции триптофановых остатков (положения спектра, квантового выхода, анизотропии флуоресценции и др.) к свойствам их окружения и особенностям локализации в молекуле белка. В работе проведено исследование

связывания квантовой точки с белком БСА, основанное на анализе внутренней флуоресценции БСА.

В итоге были решены такие фундаментальные физические задачи, как определение механизма и параметров связывания. Было выяснено, что связывание КТ с БСА происходит преимущественно по гидрофобному механизму в соотношении 1:1.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
1 Литературный обзор .....	5
1.1 Квантовые точки и их применение в медицине и биологии .....	5
1.2 Внутренняя флуоресценция белков .....	8
1.2.1 Обзор флуоресцирующих аминокислот в белках.....	8
1.2.2 Флуоресценция белка бычьего сывороточного альбумина.....	9
1.3 Аспекты комплексообразования системы белок – лиганд .....	10
1.3.1 Связывание белков с лигандами .....	10
1.3.2. Термодинамика связывания.....	12
1.3.3 Кооперативное связывание. Модель Хилла.....	13
1.4 Тушение фотолюминесценции. Уравнение Штерна-Фольмера .....	14
2 Материалы и методы .....	17
2.1 Химические реактивы.....	17
2.2 Оборудование и методика измерения.....	17
2.3 Обработка спектральных данных.....	18
3 Результаты и обсуждение.....	20
3.1 Тушение фотолюминесценции .....	20
3.2 Термодинамические параметры комплекса БСА – КТ .....	25
3.3 Стехиометрия комплекса БСА – КТ CdTe .....	27
Заключение .....	32
Список использованных источников .....	33



## ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени коллоидные квантовые точки (КТ) активно используют в различных приложениях биофизики и биосенсорики благодаря их уникальным кванторазмерным оптическим свойствам. Современная химия позволяет стабилизировать КТ различными функциональными группами для обеспечения их биосовместимости с различными биологическими объектами. Установлено, что КТ, находящиеся непосредственно в биологических средах, оказываются окруженными белками, образующие «белковую корону». Корона, образованная на поверхности КТ, становится биологически значимой и определяющей для взаимодействия между живыми клетками и КТ. Наличие такой белковой короны на поверхности наночастицы, может нести как положительный эффект (увеличивать растворимость наночастиц, уменьшать их токсичность), так и отрицательный (например, быть причиной агрегации белковых молекул и квантовых точек или изменения структуры белка), поэтому не учитывать ее наличие нельзя.

В работе исследовано связывание квантовых точек CdTe, стабилизированных  $\text{COO}^-$ -группами, и бычьего сывороточного альбумина. В основу работы положен анализ триптофановой флуоресценции БСА, чувствительный к любым изменениям в окружении и особенностях локализации в молекуле БСА.

Ц е л ь ю      д а н н о й      р а б о т ы      я в л я е т с я  
о п р е д е л е н и е   м е х а н и з м а   и   п а р а м е т р о в  
с в я з ы в а н и я   к в а н т о в о й   т о ч к и   с   Б С А .   В  
р а м к а х      д а н н о й      ц е л и      п о с т а в л е н ы  
н е с к о л ь к о   з а д а ч :

- о п р е д е л и т ь   к о н с т а н т ы   с в я з ы в а н и я  
Б С А   с   к в а н т о в о й   т о ч к и   п р и   р а з л и ч н ы х  
т е м п е р а т у р а х ;

– определить изменение  
термодинамических параметров при  
связывании БСА с квантовой точкой;

– определить стехиометрию  
комплекса БСА – КТ.

## **1 Литературный обзор**

### **1.1 Квантовые точки и их применение в медицине и биологии**

Квантовые точки (КТ) – это полупроводниковые нанокристаллы, в которых благодаря эффекту пространственного ограничения носителей зарядов проявляются квантовые свойства. Наиболее существенным из них является формирование флуоресцентных уровней – длина волны излучения флуоресценции становится зависимой от размера области пространственного ограничения, а следовательно, от размера квантовой точки.

Полупроводниковые КТ обычно синтезируют из элементов групп II–VI или III-V периодической таблицы, например, CdSe, CdTe или InAs. Для повышения эффективности флуоресценции обычно применяют КТ-структуры ядро/оболочка, в которых флуоресцирующее полупроводниковое ядро (например, из CdSe) покрывают оболочкой из другого полупроводника с более широкой запрещенной зоной (например, CdS или ZnS). Введение оболочки значительно улучшает флуоресцентные свойства КТ и их химическую устойчивость. Диаметр квантовых точек (от 1,5 нм и выше) можно контролировать в процессе синтеза, варьируя время реакции, проходящей при температуре около 300°C, от минут до нескольких часов или просто отбирая необходимое количество продукта через разное время после начала реакции, тем самым задавая нужную длину волны максимума испускания. Наиболее часто используемые в биологии и медицине нанокристаллы состоят из ядра CdSe, покрытого оболочкой ZnS, и CdTe, которые обладают (на сегодня) максимальным эффективным коэффициентом экстинкции и квантовым выходом.

Одной из наиболее активно развивающихся областей применения КТ является использование коллоидных квантовых точек (полупроводниковых нанокристаллов в органических и водных растворах) в качестве люминесцентных меток для визуализации структуры биологических объектов

разного типа и для сверхчувствительного детектирования биохимических реакций, которые крайне важны в молекулярной и клеточной биологии, медицинской диагностике и терапии. Люминесцентная метка представляет собой люминофор, связанный с молекулой-линковщиком, которая может селективно связываться с детектируемой биоструктурой (мишенью). В качестве люминофоров меток обычно используются органические красители. Но по сравнению с органическими красителями, традиционно используемыми для маркировки биологических молекул, полупроводниковые КТ обладают рядом принципиальных преимуществ (Таблица 1.1).

Таблица 1.1 – Сопоставление свойств полупроводниковых квантовых точек и органических красителей\*

	Квантовые точки	Органические флуорофоры
Возбуждение	Полоса возбуждения очень широкая. КТ всех размеров можно возбуждать одним источником света (синий или УФ)	Полоса возбуждения узкая. Положение определяется конкретным флуорофором
Пик эмиссии	Узкий, симметричный, ширина на полувысоте ~ 20-40 нм. Цвет эмиссии (от УФ до ИК) варьируется размером и материалом КТ	Широкий, асимметричный, ширина ~ 50-100 нм, не варьируемый длинноволновый «хвост»
Время жизни фотолюминесценции	Более 10 нс	Менее 5 нс
Фотостабильность	В 50-10000 раз стабильнее органических флуорофоров	Варируется в широких пределах в зависимости от типа флуорофора
Экстинкция	$\sim 10^5\text{-}10^6 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$	$\sim 10^3\text{-}10^5 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ . В 10-100 меньше экстинкции CdSe-квантовых точек



Окончание таблицы 1.1

	Квантовые точки	Органические флуорофоры
Квантовый выход	Более 20%. Зависит от оболочки, присоединенных лигандов, окружающей среды	Определяется конкретным флуорофором: 5-100%
Характерные размеры	Зависят от материала КТ: диаметр ядра от 1,5 до 10 нм	Молекулярные: меньше 0,5 нм (за исключением флуоресцентных белков: GFP 4,6 x 2,4 нм)
Гидродинамический радиус	В зависимости от оболочки и поверхностных лигандов: 1,5-40 нм	Меньше 0,6 нм (за исключением флуоресцентных белков)
Конъюгация	Как правило поливалентная	Моновалентная, поливалентная
Химические свойства	Устойчивы. В зависимости от покрытия, чувствительны к pH	Химическая устойчивость, в основном, слабая. Флуоресценция может зависеть от pH
* По данным [1, 2].		

Существенно, что нанокристаллы демонстрируют более узкие и симметричные полосы люминесценции, чем обычные органические красители. Это является чрезвычайно важным преимуществом при анализе многоцветных изображений. Дополнительным преимуществом является то, что нанокристаллы имеют широкую полосу поглощения с высоким молярным коэффициентом экстинкции, соответствующую переходам в высокоэнергетические состояния. Ее положение слабо зависит от размера квантовой точки. Поэтому в отличие от красителей оказывается возможным эффективное возбуждение люминесценции нанокристаллов разных размеров одним лазерным источником света. Однако основным преимуществом является то, что нанокристаллы имеют великолепную фотоустойчивость: они не выцветают в течение нескольких часов и даже дней. Это свойство позволяет увеличить интенсивность возбуждения для повышения чувствительности метода, а также проводить длительное (в течение недель) отслеживание поведения флуоресцентной метки в живых клетках и тканях.

Поверхностная химия нанокристаллов развита и позволяет формировать покрытия, содержащие функционализированные поверхностные слои для присоединения к ним биологических молекул и обеспечивающие биосовместимость нанокристаллов. И хотя ряд аспектов их использования еще требует выяснения, люминесцирующие метки на основе квантовых точек уже продемонстрировали свои большие возможности в биологическом анализе [3].

## **1.2 Внутренняя флуоресценция белков**

### **1.2.1 Обзор флуоресцирующих аминокислот в белках**

Все белки во всех организмах, независимо от их функций или биологической активности, построены из одного и того же основного набора 20 стандартных аминокислот, каждая из которых, взятая в отдельности, не обладает биологической активностью. Белки отличаются друг от друга своей последовательностью аминокислотных звеньев. Ни одна из двадцати аминокислот входящих в состав белков, не поглощает в видимой области спектра и лишь три из них, а именно триптофан Trp, фенилаланин Phe и тирозин Tyr, обладают заметным поглощением в ультрафиолетовой области. Триптофан и фенилаланин относятся к гидрофобным аминокислотам. Флуоресценция белков обычно возбуждается в максимуме их поглощения при 280 нм. Фенилаланин не

возбуждается в большинстве экспериментальных случаях, поскольку поглощает в области до 280 нм. К тому же квантовый выход фенилаланина в белках мал, так что испускание этого аминокислотного остатка при возбуждении 280 нм наблюдается редко. Поглощение белков при 280 нм в основном связано с тирозиновыми и триптофановыми остатками. При длинах волн более 295 нм поглощает главным образом триптофан. Поэтому предполагается, что его флуоресценция может быть селективно возбуждена в диапазоне 295-305 нм.

Испускание тирозина в воде происходит при 303 нм и сравнительно нечувствительно к полярности растворителя. Максимум испускания триптофана сильно зависит от полярности и варьируется от 330 до 350 нм в зависимости от локализации триптофана в белковой молекуле. Поэтому можно ожидать, что максимумы испускания белков должны зависеть от тех факторов, которые влияют на экспонирование триптофановых остатков в водную фазу. Например, спектр испускания

человеческого сывороточного  
альбумина претерпевает  
коротковолновый сдвиг по сравнению с  
испусканием триптофана в воде. Этот  
коротковолновый сдвиг  
интерпретирует как результат  
экранирования триптофановых  
остатков от водной фазы белков.  
Максимумы испускания некоторых  
белков варьируются главным образом  
из-за различий усредненной  
локализации этих остатков в нативных  
белках.

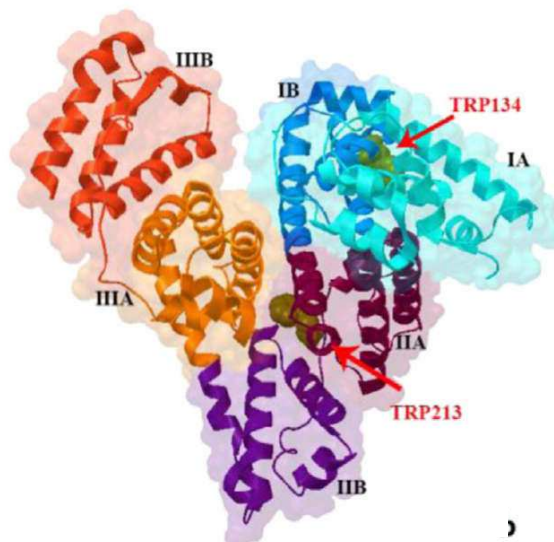
Методы флуоресцентного анализа в  
исследованиях белков применяются  
для определения изменения вторичной  
структуры белков под влиянием  
различных внешних факторов.  
Собственная флуоресценция является  
мощным инструментом для  
исследования структуры, динамики и  
процессов сворачивания -  
разворачивания белков ввиду высокой  
чувствительности различных  
параметров флуоресценции  
триптофановых остатков (положения  
спектра, квантового выхода,

анизотропии флуоресценции и др.) к свойствам их окружения и особенностям локализации в молекуле белка. Применение данных методов имеет ряд положительных аспектов, таких как возможность использования водных растворов, бесконтактность методов.

### 1.2.1 Флуоресценция белка бычьего сывороточного альбумина

Бычий сывороточный альбумин (БСА) – основной транспортный белок сыворотки крови, является удобной моделью для биофизических исследований связывания с микромолекулами в связи с его хорошей изученностью.

Молекула БСА представляет собой одну полипептидную цепь из 607 аминокислотных остатков весом 66 кДа, сложенную в виде ряда петель, организованных в три гибко связанных домена (I, II, III), каждый из которых состоит из двух субдоменов (А, В), и представляет собой форму сердца с размерами 8×8×3 нм (Рисунок 1.1).



## Рисунок 1.1 – Структура БСА

Изоэлектрическая точка примерно равна 4,9. При физиологическом значении pH 7,4 молекула альбумина несет суммарный отрицательный заряд. Белок БСА лабилен, его структура зависит от концентрации ионов водорода, ультрафиолетового облучения, высоких температур и органических растворителей.

Бычий сывороточный альбумин содержит два остатка триптофана – Trp 134 и Trp 213, тирозон (Tyr) and фенилаланин (Phe). Trp 134 находится на поверхности субдомена IV и более подвержен воздействию окружающей среды по сравнению с Trp 213, который расположен в гидрофобной полости субдомена IIА. Наличие в молекуле БСА двух триптофановых остатков позволяет использовать для исследования данного белка метод флуоресцентного анализа, а именно анализ собственной триптофановой флуоресценции белка.

### **1.3 Аспекты комплексообразования системы белок – лиганд**

#### **1.3.1 Связывание белков с лигандами**

В основе функционирования многих белков лежит образование комплексов между различными веществами (ионом, гормоном, метаболитом) – лигандом – и центрами связывания, лежащими на молекуле белка. Лигандами могут быть как низкомолекулярные вещества, так и макромолекулы. Взаимодействие белка с лигандом высокоспецифично и обратимо, что определяется строением центром связывания белка с лигандом или активным центром.

Активный центр белков, как правило, находящийся в её углублении ("кармане"), сформирован радикалами аминокислот, собранных на

определённом пространственном участке при формировании третичной структуры, и способен комплементарно связываться с лигандом. Даже незначительные нарушения общей конформации белка в результате точечных изменений его первичной структуры или условий окружающей среды могут привести к изменению химических и функциональных свойств радикалов, формирующих активный центр, нарушать связывание белка с лигандом и его функцию. При денатурации активный центр белков разрушается, и происходит утрата их биологической активности.

Образование комплекса лиганд – белок можно рассматривать как химическую реакцию (1.1), которая характеризуется константой образования комплекса или константой связывания (1.2).



$$K_a = [L_nP]/[P][L]^n, \quad (1.2)$$

где  $[P]$  – концентрация белка;

$[L]$  – концентрация лиганда;

$n$  – число связывающих центров или посадочных мест в молекуле белка.

При образовании комплекса белка с лигандом возникают связи, удерживающие лиганд в активном центре. Такие связи, в зависимости от пространственного и химического соответствия взаимодействующих молекул, могут быть выражены 4 типами нековалентных взаимодействий: силы Ван-дер-Ваальса, водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия.

### 1.3.2 Термодинамика связывания

Система белок – лиганд – растворитель представляет собой термодинамическую систему, состоящую из растворенного вещества (молекул белка и лиганда) и растворителя (воды и ионов буфера). Силы и механизмы, которые определяют связь между белком и лигандами, являются результатом различных взаимодействий и теплообменом между белком, лигандом, и молекулами растворителя. Количественными характеристиками суммарного действия всех сил является константа равновесия и изменение термодинамических функций: свободной энергии  $\Delta G$ , энтальпии  $\Delta H$  и энтропии  $\Delta S$  рассматриваемой системы. Все эти характеристики связаны фундаментальными термодинамическим соотношением (1.3) и уравнением Вант-Гоффа (1.4), описывающем зависимость константы равновесия  $K_p$  от температуры  $T$ :

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (1.3)$$

$$\ln K_p = -\Delta G / RT = \Delta S / R - \Delta H / RT, \quad (1.4)$$

где  $R = 8,31 \text{ Дж / (моль} \cdot \text{К)}$  – универсальная газовая постоянная.

Свободная энергия Гиббса характеризует способность термодинамической системы совершать максимальную или обратимую работу при постоянной температуре и давлении. По аналогии с любым спонтанным процессом связывание белок – лиганд происходит только тогда, когда изменение свободной энергии Гиббса системы отрицательно и система достигает равновесного состояния при постоянном давлении и температуре. Поскольку степень ассоциации белок-лиганд определяется величиной отрицательного  $\Delta G$  (1.4), можно считать, что  $\Delta G$  определяет стабильность любого данного комплекса белок – лиганд или, альтернативно, сродство связывания лиганда с данным белком.

Энтальпия является мерой общей энергии термодинамической системы. Фактически, изменение энтальпии при связывании является результатом



образования и разрушения многих индивидуальных взаимодействий, включая разрыв водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, которых образуются между белком и растворителем, а также между лигандом и растворителем, образованием нековалентных взаимодействий между белком и лигандом и реорганизации растворителя вблизи поверхностей молекул. Эти отдельные составляющие могут вносить либо положительный, либо отрицательный вклад, а изменение общей энтальпии является результатом сочетания этих вкладов [4].

Энтропия – это показатель того, насколько равномерно будет распределяться тепловая энергия по общей термодинамической системе. Второй закон термодинамики определяет, что тепло всегда протекает спонтанно из областей с более высокой температурой в области с более низкой температурой. Это уменьшает степень порядка исходной системы, и поэтому энтропия также может рассматриваться как мера беспорядка или случайности в атомах и молекулах системы.  $\Delta S$  – глобальное термодинамическое свойство системы, при этом положительные или отрицательные знаки указывают на общее увеличение или уменьшение степени свободы системы, соответственно [5].

### **1.3.3 Кооперативное связывание. Модель Хилла**

В 1909 году Хилл [6] предложил модель связывания кислорода с гемоглобином. Согласно модели Хилла, центры связывания кислорода на молекуле гемоглобине не являются независимыми. Присоединение первой молекулы кислорода к одному из центров увеличивает сродство к кислороду других центров, а связывание двух молекул кислорода еще более облегчает связывание третьей молекулы кислорода и т.д. Такое связывание, при котором константы связывания идентичных центров изменяются по мере заполнения центров, называется кооперативным связыванием.

Хилл рассмотрел модель с максимальной кооперативностью, то есть когда связывание первого лиганда увеличивает сродство остальных центров настолько, что они заполняются практически мгновенно. Это предположение эквивалентно тому, что связывание, представлено как реакция, протекающая по принципу «все или ничего», макромолекулы в растворе либо в несвязанном состоянии, либо в комплексе с лигандами, где все центры заняты. В действительности такой кооперативности не обнаружено. Экспериментальные данные о кооперативных взаимодействиях описывается полуэмпирическим соотношением (1.5) только в некотором интервале насыщения, обычно 25-75% [7].

$$v = \frac{n(L)^{\alpha_H}}{(K)^{\alpha_H} + (L)^{\alpha_H}}, \quad (1.5)$$

где  $v$  – степень насыщения;

$K$  – кажущаяся степень диссоциации;

$\alpha_H$  – коэффициент Хилла.

По коэффициенту Хилла определяют характер и степень кооперативности. Если  $\alpha_H = 1$ , то кооперативность отсутствует. При  $\alpha_H < 1$ , кооперативность отрицательная, то есть происходит уменьшение сродства при последовательном связывании лигандов. При  $\alpha_H > 1$  имеет место положительная кооперативность, усиление сродства по мере связывания.

#### 1.4 Тушение фотолуминесценции. Уравнение Штерна-Фольмера

Тушением флуоресценции называют любые процессы, которые уменьшают интенсивность флуоресценции данного вещества. Выделяют несколько видов тушения: динамическое тушение, связанное со случайными столкновениями между флуорофором и тушителем, и статическое тушение, связанное с образованием нефлуоресцирующегося комплекса. Как только

произошло поглощение света, комплекс немедленно возвращается в основное состояние без испускания фотона.

В этой главе рассматривается только статическое тушение по причинам, которые будут указаны позже. Зависимость интенсивности флуоресценции молекулы от концентрации тушителя легко вывести, используя константу ассоциации [8], и записывается следующим образом:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV} [T] = 1 + k_q \tau_0 [T], \quad (1.6)$$

где  $I_0$  и  $I$  – интенсивность флуорофора в отсутствие и в присутствии тушителя, соответственно;

$K_{SV}$  – Штерн-вольмеровская константа тушения, в случае статического механизма тушения  $K_{SV} = K_a$ .

$[T]$  – концентрация тушителя.

$k_q$  – бимолекулярная константа скорости тушения.

В случае тушения белков зачастую используют модифицированное уравнение Штерна-Фольмера [8]. Белки обычно содержат несколько остатков триптофана, которые находятся в различном окружении. Каждый остаток может быть по-разному доступен для тушения. Следовательно, можно ожидать отклонения от стандартных графиков Штерна-Фольмера (1.6) и даже спектральные сдвиги из-за избирательного тушения доступных и скрытых остатков триптофана. Предположим, что имеются две популяции флуорофоров, одна из которых доступна (*a*) для тушителей, а другая недоступна (*b*). В этом случае уравнение Штерна-Фольмера выглядит как

$$\frac{I_0}{I_0 - I} = \frac{1}{f_a K_a [T]} + \frac{1}{f_a}, \quad (1.7)$$

где  $f_a$  – доля собственной флуоресценции белка, доступной для тушения;

$K_a$  – константа тушения Штерна-Фольмера для доступной популяции флуорофоров или эффективная константа связывания.

Таким образом, значения  $f_a$  и  $K_a$  могут быть найдены графически с помощью модифицированного уравнения Штерна-Фольмера. Следует учитывать, что если предполагаемая «недоступная» доля флуорофоров частично доступна для тушителей, то график (1.7) будет линейным только для ограниченного диапазона концентраций тушителя.

## 2 Материалы и методы

### 2.1 Химические реактивы

В работе были использованы следующие реактивы: бычий сывороточный альбумин (БСА) («Sigma», США), КТ CdTe, стабилизированные тиогликолевой кислотой с отрицательно заряженной карбоксильной группой («PlasmaChem», Германия) с максимумом испускания на длине волны 523 нм. В качестве растворителя выбран фосфатный буфер pH 7,4 для максимальной имитации физиологической среды. Спектральные свойства используемых веществ представлены на рисунке 2.1.

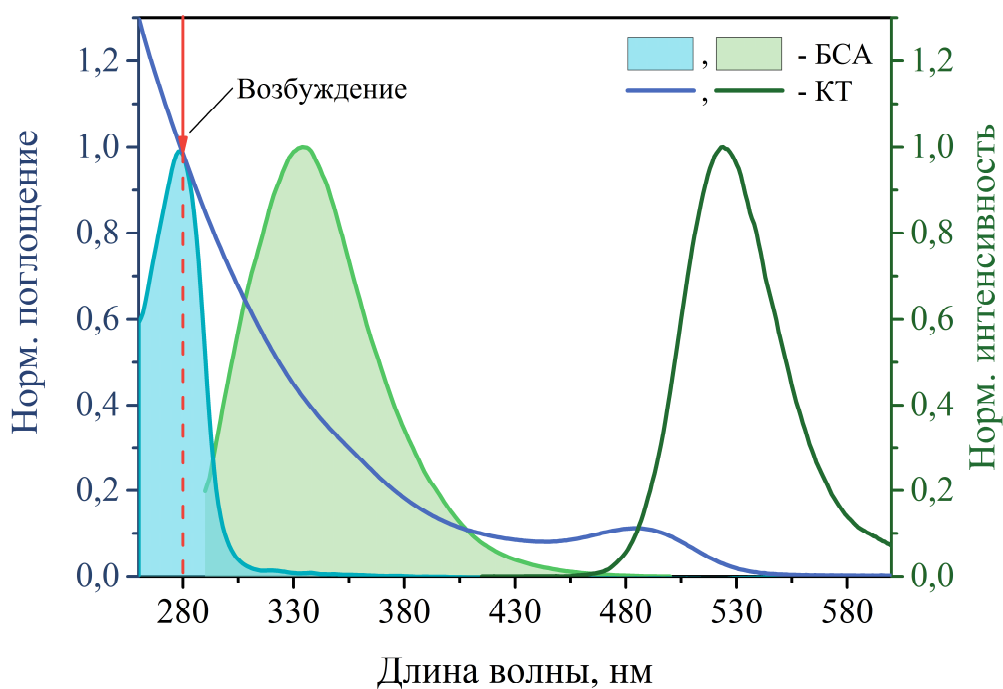


Рисунок 2.1 – Спектры поглощения и люминесценции белка БСА и квантовой точки CdTe

### 2.2 Оборудование и методика измерения

В кварцевую кювету, содержащую буферный раствор БСА, малыми дозами добавляли концентрированный раствор квантовых точек. При этом регистрировались спектры поглощения и люминесценции после каждого

добавления. Первая серия экспериментов проводилась при комнатной температуре – 298 К, последующие измерения проводились в интервале температур 288 ÷ 308 К. Диапазон исследуемых концентраций КТ составил 0,3÷2,3 мкМ. Концентрация БСА в растворе составила в среднем 2,4 мкМ.

Измерение спектров поглощения проводились на спектрофотометре Lambda 35 (Perkin Elmer, США). Область сканирования была выбрана исходя из спектральных характеристик исследуемых образцов – 280-550 нм. Спектры люминесценции образцов были сняты с использованием спектрофлуориметра Fluorolog 3-22 (Horiba Jobin Yvon, США) с термостатом для установки температурного режима. Диапазон сканирования длин волн для люминесценции составил 290-425 нм. Спектральные щели, входная и выходная, были равны 3,3-3,5 нм. Длина волны возбуждения (280 нм) была подобрана таким образом, чтобы добиться избирательного возбуждения триптофановых остатков в составе белка.

### **2.3 Обработка спектральных данных**

При анализе спектров люминесценции были учтены параметры, искажающие форму контура: фон от растворителя, разведение, эффект внутреннего фильтра и реабсорбции [9-11].

Эффект внутреннего фильтра заключается в том, что интенсивность возбуждающего света в объеме образца удаленном от источника света меньше, чем в ближайшем к источнику объеме. Передние слои образца работают как фильтр, поглощающий большую часть возбуждающего света. Освещенность образца становится неравномерной, а интенсивность люминесценции уменьшается.

Другой тип эффекта внутреннего фильтра, реабсорбция, связан с перепоглощением излученного света люминесценции; это может быть поглощение избыточной концентрацией или просто высокой поглощающей способностью растворенного флуоресцирующего вещества. Тем самым

реабсорбция вызывает искажения формы спектра испускания исключительно в области его перекрывания со спектром поглощения. На рисунке 2.1 видно, что на длине волны возбуждения приходится максимум поглощения белка и КТ.

Для восстановления спектра люминесценции и учета влияния этих эффектов использовали формулу [10]:

$$I_{кор} = I_0 \cdot 10^{(D(\lambda_{ex}) + D(\lambda_{em})) \cdot l / 2}, \quad (2.1)$$

где  $I_0$  – наблюдаемая интенсивность света;

$I_{кор}$  – скорректированная интенсивность света, которая должна была бы наблюдаться в отсутствие эффектов внутреннего фильтра;

$D(\lambda_{ex})$  – оптическая плотность образца на длине волны возбуждения;

$D(\lambda_{em})$  – оптическая плотность образца на длине волны испускания;

$l$  – сторона квадратного сечения кюветы ( $l=1$  см).

### 3 Результаты и обсуждение

#### 3.1 Тушение фотолюминесценции

После обработки спектральных данных выявлено, что положение максимума излучения и квантовый выход фотолюминесценции КТ на длине волны в 523 нм не изменяются в присутствии БСА. Однако существенные изменения наблюдаются в случае флуоресценции белка. Как уже обсуждалось, внутренняя флуоресценция БСА обусловлена главным образом наличием двух остатков триптофанов. Любые изменения квантового выхода или положения максимума излучения непосредственно указывают на изменение полярности среды, окружающей эти два флуорофора, вследствие изменения нативной конформации белка. Поэтому собственную флуоресценцию БСА используют для контроля связывания с различными лигандами, в том числе и с квантовыми точками [12-14]. На рисунке 3.1 изображено влияние увеличения концентрации КТ на излучение БСА.

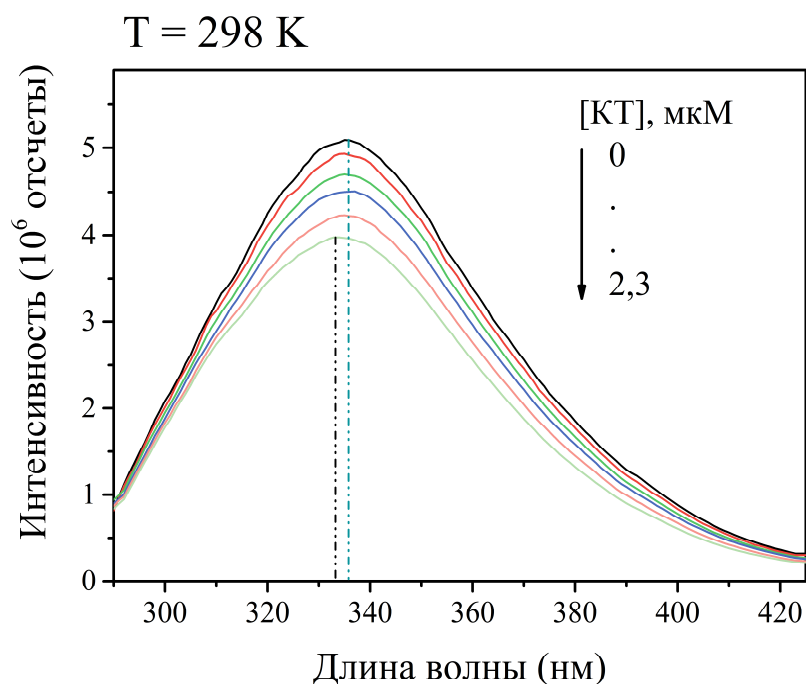


Рисунок 3.1 – Тушение флуоресценции БСА при различных добавлениях КТ при комнатной температуре



При постепенном добавлении КТ происходит тушение флуоресценции БСА на 22%. При этом наблюдается смещение спектра на 2 нм в синюю область в присутствии 2 мкМ КТ. Эти спектральные изменения ясно указывают на связь между БСА и КТ и некоторых изменений структуры белка.

Механизм наблюдаемого флуоресцентного тушения может быть обусловлен как динамическим или статическим, так и комбинацией обоих этих процессов. В самом общем случае, чтобы выявить механизм тушения, используют уравнение Штерна-Фольмера (1.6). В случае присутствия одного вида тушения, график в координатах Штерна-Фольмера имеет линейный характер, и отклоняется вверх от линейной зависимости в случае совместного действия статического и динамического тушений. Экспериментальные данные по тушению в координатах Штерна-Фольмера представлены на рисунке 3.2.

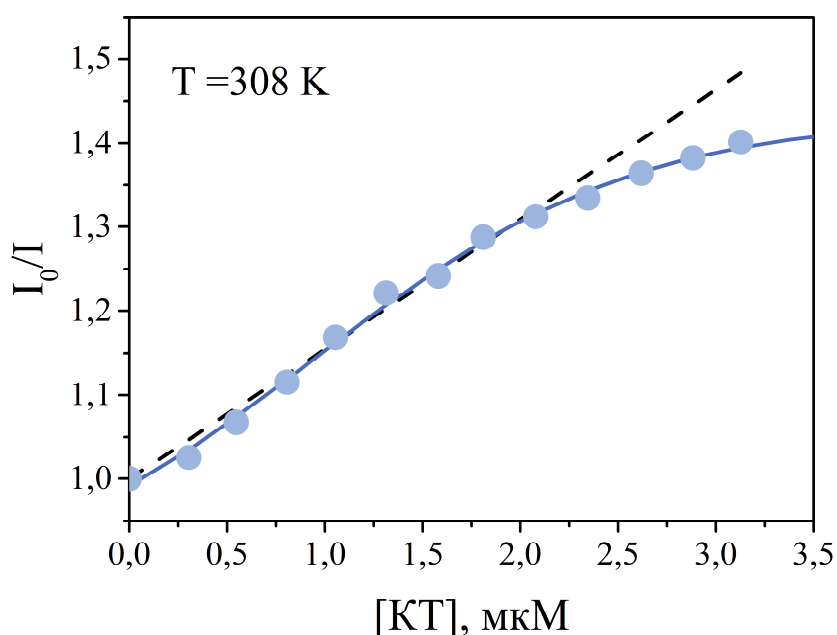


Рисунок 3.2 – Тушение флуоресценции БСА в координатах Штерна-Фольмера ( $I_0$ ,  $I$  – интенсивность флуоресценции БСА в отсутствие и в присутствии КТ)

График Штерна-Фольмера отклоняется вниз от линейной зависимости, а не вверх, как было сказано выше. Поэтому идентифицировать механизм тушения данным способом невозможно. Такое поведение характерно для

случая белков с двумя популяциями флуорофоров таких, как белок БСА с двумя остатками триптофанов. Также коротковолновое смещение спектра флуоресценции БСА указывает на то, что те триптофановые остатки, которые излучают на больших длинах волн, сильнее подвержены тушению, чем триптофаны, излучающие на более коротких длинах волн. Поэтому для описания тушения флуоресценции БСА использовано модифицированное уравнение Штерна-Фольмера (1.7). Полученные зависимости для всех исследуемых температур приведены на рисунке 3.3.

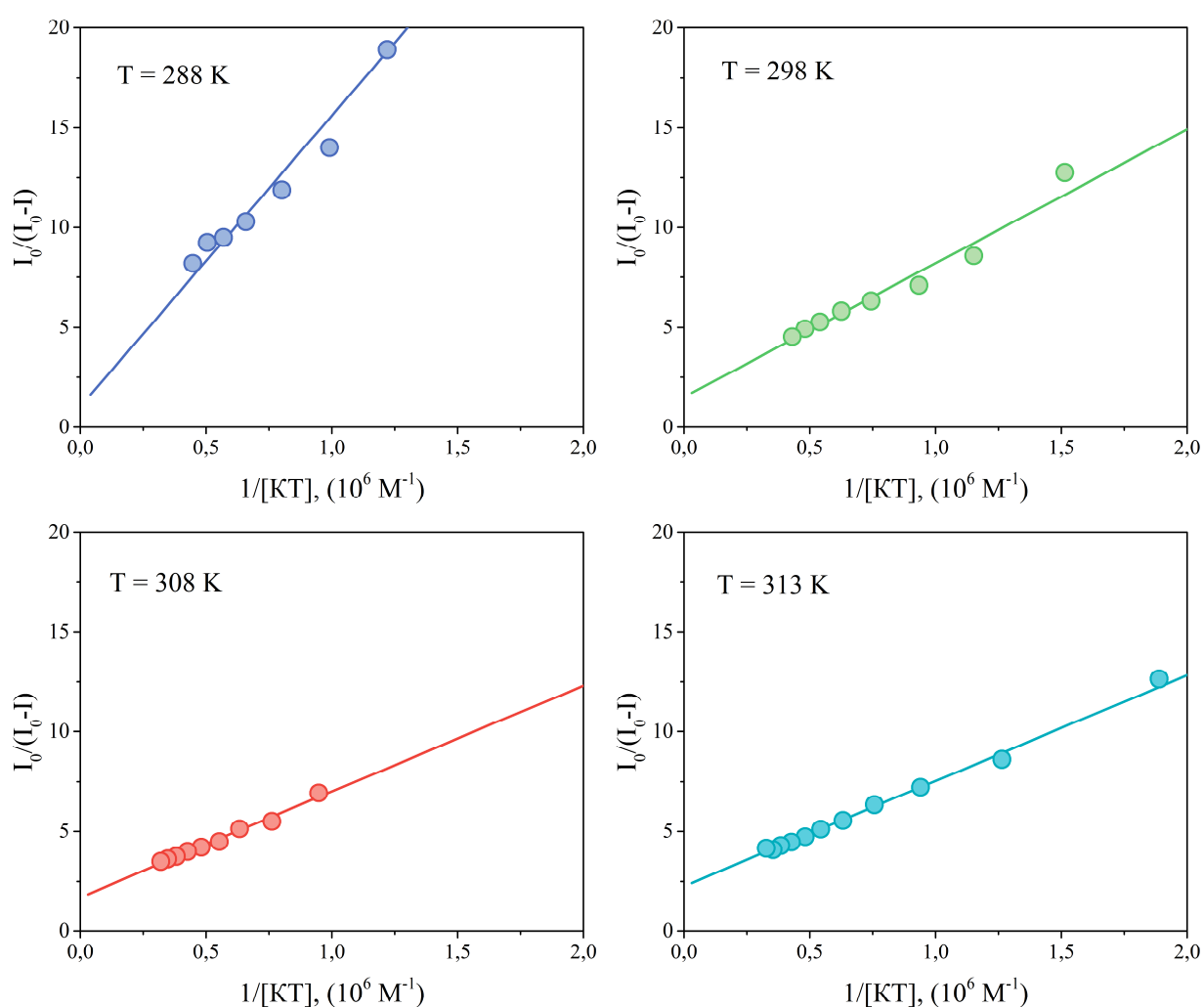


Рисунок 3.3 – Тушение флуоресценции БСА в координатах модифицированного Штерна-Фольмера при различных температурах

Полученные параметры при аппроксимации экспериментальных данных и коэффициент корреляции приведены ниже в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Параметры аппроксимации данных модифицированным уравнением Штерна-Фольмера

$T, K$	$K_a, 10^5 M^{-1}$	$k_q, 10^{13} M^{-1} s^{-1}$	$f_a$	$R^2$
288	0,7	1,3	0,97	0,98
298	2,2	4,1	0,67	0,99
308	3,2	5,9	0,58	0,99
313	4,3	7,9	0,44	0,99

Эффективная константа связывания определяется по наклону графиков на рисунке 3.3 и во всем исследуемом температурном интервале порядка  $\sim 10^5$ . Значения  $f_a$  уменьшается с ростом температуры, что указывает на то, что при увеличении температуры доля от общей флуоресценции БСА, доступной для тушения, уменьшается с 97% до 44%.

Бимолекулярная константа скорости тушения рассчитана с использованием значения времени жизни белка БСА 5,6 нс [15]. Полученные значения  $\sim 10^{13}$ , что на 3 порядка выше, чем для чисто динамического механизма тушения с участием кислорода [16, 17], рассматриваемого как наибольшее из возможных значений для водных растворов. Следовательно, в наблюдаемой системе тушение флуоресценции БСА может быть связано с формированием межмолекулярного комплекса в основном состоянии, а не за счет столкновительных процессов, как при динамическом тушении.

Другой более четкий способ для различия динамического тушения и образования комплекса – измерение времен жизни флуоресценции. Из-за статического тушения часть флуорофоров не наблюдается: связанные в комплекс флуорофоры не флуоресцируют, и наблюдается флуоресценция только несвязанных флуорофоров. Не связанная в комплекс часть флуорофоров не возмущена, для нее время затухания равно  $\tau_0$ , то есть такое же, как и в

отсутствие тушителя. Таким образом, для статического тушения  $\tau_0/\tau=1$ , в то время как для динамического –  $I_0/I = \tau_0/\tau$ .

Учитывая чувствительность белка к излучению света в УФ области, измерения спектров затухания флуоресценции БСА и соответственно определения времен жизни не были реализованы. При длительном облучении на длине волны в 280 нм структура белка претерпевает изменения, и тем самым меняется окружение триптофанов остатков, что приводит к еще одной причине для изменения их спектральных свойств, дополнительного к процессу связывания. Хотя существует ряд работ, в которых проводятся подобные измерения. Например, в работе [12] авторы утверждают, что при добавлении КТ в раствор с БСА среднее время жизни белка значительно не изменяется (уменьшается на 3% при максимальной концентрации тушителя), что доказывает статический механизм тушения. Это номинальное уменьшение времени жизни в присутствии самой высокой концентрации КТ, может быть связано с локальными конформационными изменениями БСА при адсорбции.

Исходя из этих результатов, трудно определить, какой из остатков триптофана в составе БСА тушится при адсорбции. Однако эти два триптофановых остатка (Trp 134 и 213) расположены в двух отдельных доменах и в различном окружении. Trp 134 расположен на поверхности белка в субдомене IB, тогда как Trp 213 находится в гидрофобной полости субдомена ПА. Гидрофобные взаимодействия приведут к связыванию КТ в гидрофобном кармане связывания в субдомене ПА вблизи Trp 213, в то время как взаимодействия электростатического характера и образование водородных связей приведут к связыванию вблизи остатка Trp 134. Тем самым характер взаимодействий между КТ и БСА позволит определить, какой из триптофанов тушится во время процесса связывания. Для решения этого фундаментального вопроса о механизме связывания рассчитаны различные термодинамические параметры, которые обсуждаются в следующем разделе.

### 3.2 Термодинамические параметры комплекса БСА-КТ

Считается, что образование комплекса является термодинамическим процессом, и константы связывания зависят от температуры системы. Поэтому для характеристики действующих сил между взаимодействующими молекулами анализируют зависимость термодинамических параметров от температуры. В случае простой модели равновесия двух состояний, как в исследуемой системе, термодинамические параметры (изменение энтальпии, энтропии и свободной энергии Гиббса) можно рассчитать по уравнению Вант-Гоффа (1.4). Экспериментальные данные в соответствии с уравнением Вант-Гоффа представлены на рисунке 3.4.

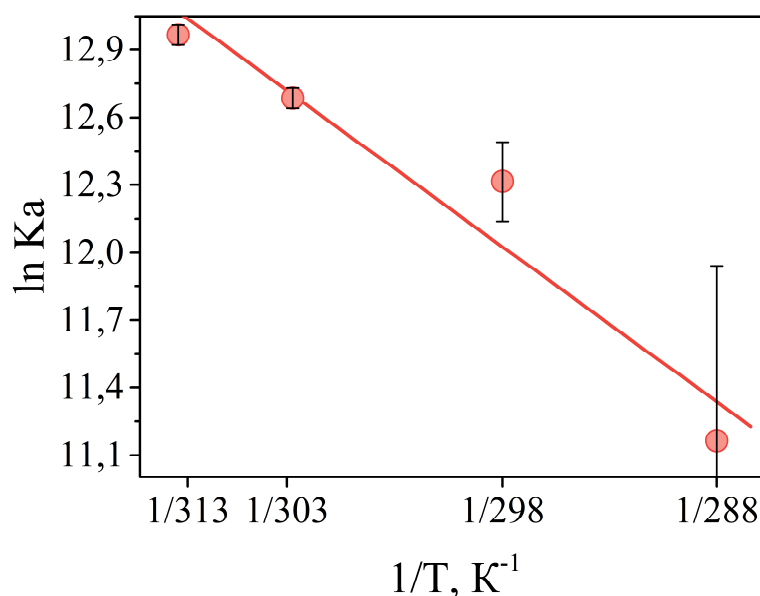


Рисунок 3.4 – Уравнение Вант-Гоффа

Полученные термодинамические параметры приведены в таблице 3.2. Обнаружено, что процесс связывания сопровождается положительным изменением энтальпии и энтропии, но при этом отрицательным изменением энергии Гиббса. Ранее, основываясь на величине и знаке термодинамических параметров, учеными были определены различные механизмы связывания белков с различными лигандами. Это условное термодинамическое правило

было обобщено в работе [18]. В общем, процессы связывания, вызванные гидрофобными взаимодействиями между белками и лигандами, протекают с большим положительным изменением энтропии с положительным изменением энтальпии, тогда как процессы, вызванные электростатическими взаимодействиями, протекают с положительным изменением энтропии и с небольшим положительным или отрицательным изменением энтальпии. Отрицательное изменение энтальпии с отрицательным изменением энтропии наблюдается во многих ассоциативных процессах и связано с вовлечением специфических взаимодействий водородных связей.

Таблица 3.2 – Термодинамические параметры связывания КТ с БСА

$T, K$	$\Delta G, \text{кДжМ}^{-1}$	$\Delta H, \text{кДжМ}^{-1}$	$\Delta S, \text{ДжМ}^{-1}$
288	-27,1	51,0	271
298	-29,8		
308	-32,5		
313	-33,9		

Отрицательное значение  $\Delta G$  показывает, что процесс взаимодействия происходит спонтанно. Положительное изменение энтальпии  $\Delta H$  указывает на эндотермический характер связывания, то есть процессы разрывов отдельных связей преобладают над образованием новых связей. Положительное изменение энтропии  $\Delta S$  происходит из-за того, что молекулы воды, упорядоченные по отношению к КТ и белку, приобретают более случайную конфигурацию в результате связывания. Таким образом, учитывая экспериментальные данные и вышеизложенное правило, можно заключить, что при связывании квантовой точки и белка БСА определяющую роль играют гидрофобные взаимодействия.

Стоит отметить, что именно гидрофобные взаимодействия играют определяющую роль в формировании пространственной структуры белка, и имеют принципиальное значение для их функционирования. Благодаря

гидрофобным взаимодействиям белки при сравнительно большой молекулярной массе обладают сравнительной компактной структурой, при этом компактно упакованная глобула находится в одной, наиболее устойчивой конформации.

Ранее нами была проделана работа по сравнению эффективности переноса энергии возбуждения между квантовой точкой и красителем, связанных с белком, в зависимости от заряда поверхности КТ. Известно, что при значении pH выше изоэлектрической точки, как в случае физиологического значения pH 7,4, поверхность белка БСА преимущественно отрицательно заряжена. В то же время, в качестве доноров были выбраны разноименно заряженные КТ CdSe/ZnS, а в роли акцептора выступала анионная форма ксантенового красителя эритрозина Б. Как показал эксперимент, эффективность безызлучательного переноса энергии в случае отрицательно заряженной КТ выше, чем для положительно заряженной КТ при одинаковых спектральных свойствах обеих донорно-акцепторных пар. Полученный результат говорит об отсутствии решающей роли электростатического механизма связывания квантовой точки с белком.

### **3.3 Стехиометрия комплекса БСА-КТ CdTe**

Для описания соотношения, в котором происходит связывание белка с квантовой точкой, используют нелинейную модель кооперативного связывания – модель Хилла (1.5). В данной модели описывается зависимость доли связанного белка или концентрации образованного с белком комплекса от концентрации присутствующего в растворе лиганда при постоянной температуре. Кривая, построенные в таких координатах, называется изотермой связывания.

Стоит добавить, что доля связанного в комплекс белка находится с помощью экспериментальных данных по тушению флуоресценции БСА,

исходя из предположения, что образовавшийся комплекс не флуоресцирует [19].

$$c_{bound} = \frac{I_0 - I}{I_0 - I_{lim}} c_0, \quad (3.1)$$

$$\nu = \frac{c_{bound}}{c_0}, \quad (3.2)$$

где  $I_0$  и  $I$  – интегральная интенсивность флуоресценции БСА в отсутствие и в присутствии КТ, соответственно;

$c_{bound}$  и  $c_0$  – концентрация связанного ([БСА+КТ]) и начального количества белка ([БСА]), соответственно;

$I_{lim}$  – предельное значение интегральной интенсивности флуоресценции БСА в процессе тушения;

$\nu$  – доля связанного белка от общей концентрации.

График насыщения интенсивности флуоресценции БСА от концентрации КТ представлен на рисунке 3.5.

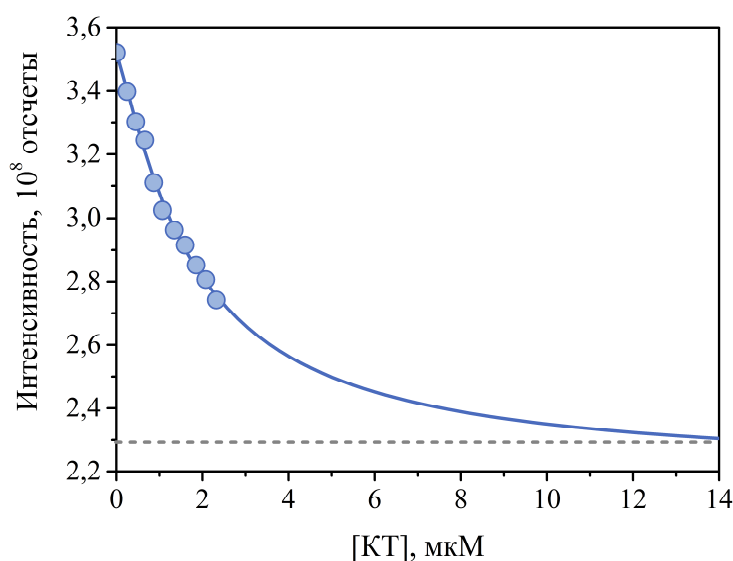


Рисунок 3.5 – Интегральная интенсивность флуоресценции БСА при различных концентрациях КТ



На рисунке 3.6 представлена изотерма связывания на примере экспериментальных данных при комнатной температуре.

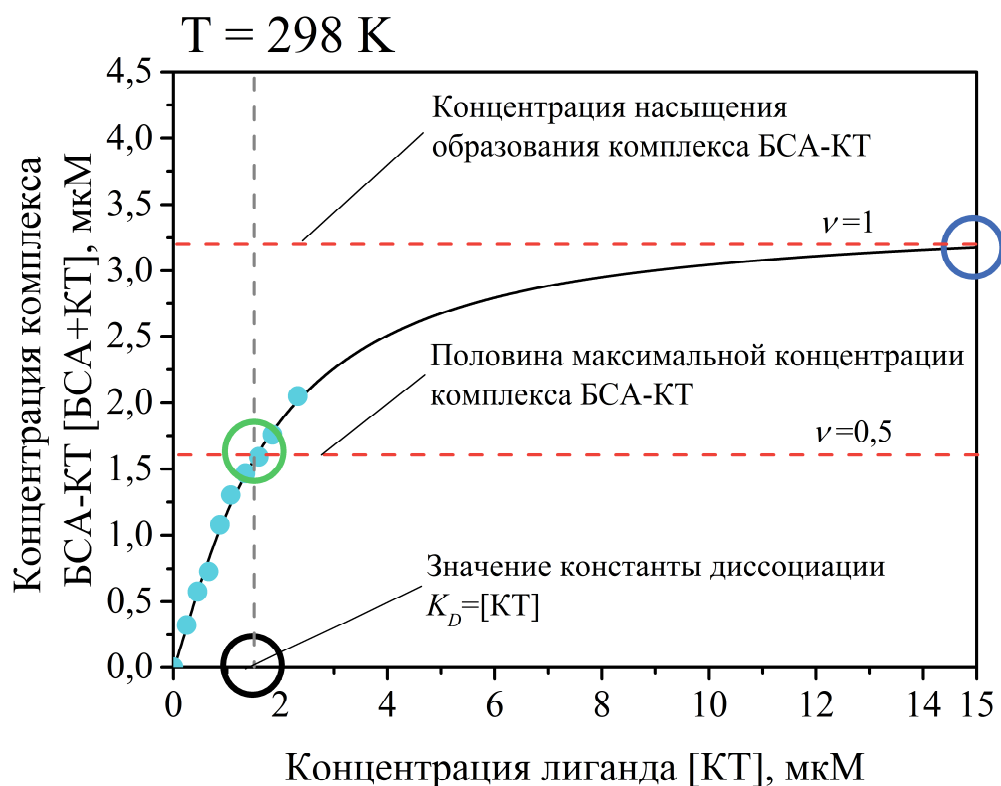


Рисунок 3.6 – Изотерма связывания БСА с КТ при комнатной температуре

Форма изотермы связывания, показанная на рисунке 3.6, является так называемой прямоугольной гиперболой. Как у любой функции семейства гипербол, у данной изотермы есть асимптота, к которой стремится кривая. На графике это горизонтальная «полочка», которая соответствует случаю, когда все белки находятся в связанном состоянии  $\nu = 1$  (синяя область). При значении параметра  $\nu$ , равному 0,5 (зеленая область), только половина белков находятся в связанном состоянии, и это происходит при концентрации лиганда (1,7 мкМ), численно равной константе диссоциации. Соответствующие значения констант диссоциации и числа посадочных мест, полученных на основании модели Хилла, приведены в таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Параметры аппроксимации данных в соответствии с моделью Хилла

$T, K$	$K_d, 10^{-6} M$	$n$	$n_H$	$R^2$
288	0,7	0,93	1,4	0,98
298	1,7	0,98	1,2	0,99
308	1,3	0,94	1,7	0,99
313	1,6	0,96	1,2	0,99

Как можно увидеть из таблицы, константа диссоциации имеет тенденцию к увеличению при увеличении температуры. Коэффициент Хилла, который является показателем кооперативности системы, для всех полученных значений больше 1. Это указывает на то, что связывание КТ с белком происходит по кооперативному механизму. Усредненное значение числа посадочных мест на белке и ошибка, полученные на основании модели Хилла, приведены на рисунке 3.7.

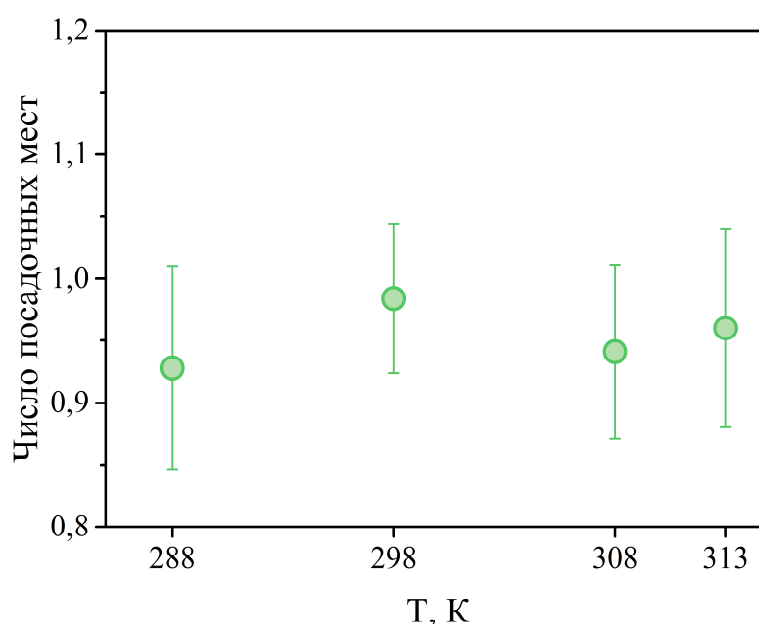


Рисунок 3.7 – Усредненное значение числа посадочных мест на белке при различных температурах

С учетом полученной ошибки, среднее число квантовых точек, приходящихся на один белок, равно 1. Полученное значение совпадает со значениями, приведенными в работах, в которых также рассматривается

связывания различных квантовых точек, отличающихся по параметрам (размер, заряд поверхности) с бычьим сывороточным альбумином или с его аналогом, сывороточным альбумином человека [11-14, 20]. Данное значение выглядит физически оправданным, поскольку размеры квантовых точек с учетом слоя стабилизатора (3-5 нм) сопоставим с размерами белка (3×3×8 нм).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были достигнуты следующие результаты:

- показано, что в присутствии квантовых точек наблюдается статический тип тушения флуоресценции БСА за счет образования нефлуоресцирующего комплекса в основном состоянии;
- по анализу собственной триптофановой флуоресценции белка, а именно по тушению флуоресценции БСА в присутствии лиганда – квантовой точки, были получены эффективные константы связывания ( $\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$ );
- на основании функциональной зависимости коэффициентов связывания от температуры определены термодинамические параметры. Полученные результаты:  $\Delta S = 212 \text{ Дж/моль}$ ,  $\Delta H = 30,9 \text{ кДж/моль}$  и  $\Delta G = -30,5 \text{ кДж/моль}$  при 298 К, указывают на то, что при связывании белка БСА и квантовой точки имеет место гидрофобный механизм;
- на основании модели Хилла показано, что связывание КТ с белком происходит по кооперативному механизму со стехиометрии 1:1.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Resch-Gender, U. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels / U. Resch-Gender [et al.] // *Nature methods*. – 2008. – Vol. 5(9). – P. 763-775.
2. Олейников, В. А. Полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы (квантовые точки) в белковых биочипах / В. А. Олейников // *Биоорг. химия*. – 2011. – №37(2). – С. 171-189.
3. Qdot Nanocrystal Applications [Электронный ресурс]: Quantum Dot Corporation. – USA. – Режим доступа: [www.qdots.com](http://www.qdots.com).
4. Perozzo, R. Thermodynamics of protein-ligand interactions: History, presence, and future aspects / R. Perozzo, G. Folkers, L. Scapozza // *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* – 2004. – №24. – P. 1-52.
5. Du, X. Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods / X. Du, Y.-L. Ai, J. Liang et al. // *Int. J. of Mol. Sci.*. – 2016. – Vol. 17. – P. 144-178.
6. Hill, A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. / A.V. Hill // *J Physiol*. – 1910. – Vol. 40. – P. 4-7.
7. Кантор, Ч. Биофическая химия в 3-х томах. Т.3. / Ч. Кантор, П. Шиммел; пер. с англ. А.А. Богданова, Ю.С. Лазуркина, М.Д. Франк-Кенецкого. – Москва: Мир, 1985. – 536 с.
8. Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy / J.R. Lakowicz. – Maryland: University of Maryland School of Medicine, 2003. – 960 p.
9. Андреев, А. И. Измерение спектров отражения, пропускания, прозрачности, люминесценции и возбуждения излучения [Электронный ресурс] / А.И.Андреев, С.В.Мухин, А.В.Пауткина; под ред. В.В.Некрасова, В.А.Никитенко. – Москва, 2008. – Режим доступа: <http://www.avantes.ru/articles/up1/10.php>.

10. Паркер, С. Фотолюминесценция растворов / С. Паркер; пер. с англ. Н. Л. Комиссаровой, Б. М. Ужинова, под ред. Р. Ф. Васильева. – Москва: Мир. – 1972. – 512 с.
11. Kubista, M. Experimental correction for the inner-filter effect in fluorescence spectra / M. Kubista, R. Sjoback, S. Eriksson. // *Analyst*. – 1994. – Vol. 119. – P. 417-419.
12. Chatterjee, S. Spectroscopic investigation of interaction between bovine serum albumin and amine-functionalized silicon quantum dots / S. Chatterjee, T. Kanti // *Phys.Chem.Chem.Phys.* – 2014. – Vol. 16. – P. 8000-8408.
13. Lai, L. Spectroscopic studies on the interactions between CdTe quantum dots coated with different ligands and human serum albumin / L. Lai, C. Lin, Z.-Q. Xu et al. // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*. – 2012. – Vol. 97. – P.366-376.
14. Kotresh, M. G. Interaction and energy transfer studies between bovine serum albumin and CdTe quantum dots conjugates: CdTe QDs as energy acceptor probes / M. G. Kotresh, L. S. Inamdar, M. A. Shivkumar et al. // *Luminescence*. – 2016. – P. 1-9.
15. Tayeh, N. Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins / N. Tayeh // *J. Pharm Biomed Anal.* – 2009. – Vol. 50. – P. 107-116.
16. Ware, W. R. Oxygen quenching of fluorescence in solution: an experimental study of the diffusion process / W. R. Ware // *J. Phys. Chem.* – 1962. – Vol. 66 (3). – P. 455–458.
17. Tachiya, M. Influence of the mean free path of reactant particles on the kinetics of diffusion-controlled reactions: Escape probability of geminate recombination / M. Tachiya // *Chem. Phys. Lett.* – 1986. – Vol. 127(1). – P. 55-59.
18. Ross, P. D. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability / P. D. Ross, S. Subramanian // *Biochemistry*. – 1981. – Vol. 20(11). – P. 3096-3102.

19. Kenneth, A. C. Binding constants: the measurement of molecular complex stability / A. C. Kenneth. – New York: Wiley, 1987. – 417 p.
20. Jhonsi, M. A. Spectroscopic studies on the interaction of colloidal capped CdS nanoparticles with bovine serum albumin / M. A. Jhonsi, A. Kathiravan, R. Renganathan // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – Vol. 75. – 2009. – P. 167-172.



Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт инженерной физики и радиоэлектроники  
Базовая кафедра фотоники и лазерных технологий

УТВЕРЖДАЮ

Зав. баз. кафедрой ФилТ

А.Н. Втюрин

«   »     2018 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Спектральное исследование связывание квантовой точки с белком

16.04.01 «Техническая физика»

16.04.01.02 «Оптическая физика и квантовая электроника»

Научный руководитель

Слюсарева

профессор,  
д-р физ.-мат.наук

Е.А. Слюсарева

Выпускник

Мережко

А.Г. Мережко

Рецензент

Александровский

ст. науч. сотр. ИФ СО РАН,  
канд. физ.-мат.наук

А.С. Александровский

Красноярск 2018